

Méthode d'analyse en santé des végétaux

RÉFÉRENCE : ANSES/LSV/MA034 - Version 2

Février 2017

Détection des Pospiviroides par RT-PCR en point final sur feuilles de plantes hôtes

Laboratoire de la santé des végétaux
Laboratoire national de référence « Viroïdes sur toutes matrices »



Historique de la méthode

Une méthode peut être mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est considérée comme majeure dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

Une modification est considérée comme mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode.

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
v1		Septembre 2013	Version initiale (initialement codifiée sous MOA 034 version1a)
v2	mineures	Février 2017	Modifications mineures suivantes : Changement de format (MOA → MA ANSES) et de code identifiant (suppression du « O ») Mise à jour de la classification du MPVd. Reformulation de paragraphes. Description détaillée des modalités d'extraction de l'ARN. La limite de détection peut être réalisée avec 3 puits sur 3 donnant un résultat positif. Formulation du résultat d'analyse : suppression des guillemets. Les extraits d'ARN peuvent être envoyés frais, congelés ou lyophilisés. Ajout du § 10 «Caractéristiques de performance de la méthode»

* La version 2 a fait l'objet d'une consultation du public du 02 décembre 2016 au 02 janvier 2017 sur le site internet de l'agence, notamment auprès des laboratoires agréés français.



Avant-propos

La présente méthode a été développée par :

Anses - Laboratoire de la santé des végétaux – Unité de Bactériologie, Virologie et OGM

Laboratoire national de référence (LNR) dans le domaine de compétence « viroïdes sur toutes matrices ».

Adresse :

7 rue Jean Dixmères

49044 ANGERS Cedex 01

France

Tél : +33(0)2 41 20 74 20

Contact : angers.lsv@anses.fr

Les travaux méthodologiques effectués sur la méthode ont donné lieu à un rapport de validation (06/08/2013). Le rapport de validation, ainsi que la méthode ont été revus par l'unité « Développement de méthodes et analyses » du Laboratoire de la Santé des Végétaux et par des pairs scientifiques : Armelle MARAIS (INRA, FR) et Thibaut OLIVIER (CRA – W Gembloux, BE).



Sommaire

Avant-propos.....	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	6
1 Objet, domaine d'application et précautions particulières	7
1.1 Objets susceptibles d'être soumis à analyse.....	7
1.2 Précaution(s) particulière(s) à prendre.	7
2 Documents de référence.....	8
3 Termes, sigles et définitions	8
4 Principe de la méthode	9
5 Réactifs	10
5.1 Eau	10
5.2 Kits d'extraction d'ARN de plante.....	10
5.3 Oligonucléotides.....	10
5.4 Pré-mix commercial.....	10
5.5 Contrôles	10
5.6 Autres consommables à usage unique.....	11
6 Appareillage et matériels	12
6.1 Thermocycleur pour PCR point final	12
6.2 Broyeur	12
7 Échantillons.....	13
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	13
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	13
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	13
8 Mode opératoire	13
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	14
8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ARN total	14
8.3 Détection par RT-PCR point final	14
8.3.1 Test RT-PCR « Posp1 »	15
8.3.2 Test RT-PCR « CLVd »	15
8.3.3 Electrophorèse.....	17
9 Résultats.....	17
9.1 Contrôle de la validité des résultats	17
9.2 Calculs et expression des résultats	18
10 Caractéristiques de performance de la méthode	18
Bibliographie.....	19



Introduction

Les viroïdes sont les plus petits organismes pathogènes connus. Ils sont constitués d'une molécule d'ARN simple brin circulaire dont la taille varie de 246 à 399 bases et sont classés, en fonction de leurs propriétés génétiques et de leur réplication en deux familles, les *Avsunviroidae* et les *Pospiviroidae* (Flores *et al.*, 2000).

Parmi la famille des *Pospiviroidae*, le genre *Pospiviroid* dont la détection fait l'objet de cette méthode, est réglementé en Europe et en France et fait l'objet de mesures de contrôles. Il contient neuf membres : *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), *Columnea latent viroid* (CLVd), *Tomato plancha macho viroid* (TPMVd) (Verhoeven *et al.*, 2011), *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd), *Iresine Viroid* (IrVd) (Hadidi *et al.*, 2003).

A l'exception de l'IrVd (Verhoeven *et al.*, 2010), tous ces pospiviroïdes sont susceptibles d'infecter les plantes de la famille des *Solanaceae*. Ils sont responsables de nombreux dégâts sur culture et en particulier sur tomate où les symptômes les plus souvent observés sont le rabougrissement des plantes, une réduction de la production et du calibre des fruits (Monger *et al.*, 2010). Ils peuvent également infecter naturellement (PSTVd) ou artificiellement (CEVd, CLVd, PCFVd, TASVd, TCDVd, TPMVd, CSVd) la pomme de terre et entraîner la formation de tubercules fusiformes. Ils peuvent également infecter naturellement d'autres espèces telles que les Citrus (CEVd), l'avocat (PSTVd) ou des plantes ornementales (CSVd). Si leur gamme naturelle est relativement restreinte aux solanacées, artificiellement cette gamme est beaucoup plus large et s'étend à de nombreuses plantes ornementales où ils peuvent être présents de façon latente (EFSA, 2011).

Leur principal mode de transmission se fait par contact de plante à plante ou par greffage. Pour certains, ils peuvent être également transmis par la semence (PSTVd, TASVd, TCDVd, PCFVd) ou par pucerons (TPMVd) (Hadidi *et al.*, 2003).



Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

Certains réactifs utilisés dans cette méthode peuvent présenter un risque pour l'utilisateur et/ou l'environnement. L'utilisateur doit impérativement suivre les recommandations du fournisseur pour l'utilisation de ces produits et l'élimination des déchets.

Par ailleurs, l'utilisateur de la présente méthode doit mettre en œuvre toutes les mesures nécessaires pour garantir la non-dissémination de l'organisme nuisible dans l'environnement.

Ainsi, tout fragment de matériel végétal infecté et les consommables ayant été en contact avec le matériel végétal infecté doit être détruit par autoclavage ou autre moyen inactivant les viroïdes.

Le matériel ayant été en contact avec le végétal infecté doit être désinfecté.



1 Objet, domaine d'application et précautions particulières

L'objet de cette méthode est de détecter la présence de tous les viroïdes connus appartenant au genre *Pospiviroid*, à partir d'un échantillon constitué de feuilles de plantes légumières (ex : *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*...) et/ou de plantes ornementales (ex : *Solanum spp.*, *Brugmansia spp.*,...) symptomatiques ou asymptomatiques. Cette méthode est qualitative, elle permet de détecter les pospiviroides mais pas de les quantifier dans l'échantillon analysé.

Ce test s'appuie dans un 1^{er} temps sur une extraction d'ARN puis dans un 2^{ème} temps sur deux tests de RT-PCR point final. Un premier test de RT-PCR point final utilisant un couple d'amorces permettant la détection générique des huit pospiviroides suivants : *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd), *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Tomato planta macho viroid* (TPMVd) (Verhoeven *et al.*, 2011), *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd), *Iresine viroid* (IrVd) (Verhoeven *et al.*, 2004) et un second test de RT-PCR point final utilisant un couple d'amorces permettant la détection spécifique du *Columnea latent viroid* (CLVd) (Spieker, 1996).

1.1 Objets susceptibles d'être soumis à analyse.

La méthode s'applique à des feuilles fraîches, congelées ou lyophilisées de plantes hôtes. De façon préférentielle, des feuilles fraîches sont utilisées.

1.2 Précaution(s) particulière(s) à prendre.

Transmis très facilement par contact, la manipulation de ces agents pathogènes doit être réalisée avec précaution afin d'éviter toute contamination croisée des échantillons lors des prises d'essai. Le matériel utilisé pour chaque échantillon doit être à usage unique (sachets de broyage, gants, scalpels, papier de protection de surface ou « bench coat ») ou désinfecté entre chaque échantillon (outils, pailleuse) par une solution de Javel à environ 0,5% de chlore actif ou toute autre solution appropriée à la destruction des viroïdes.

De la même façon des précautions particulières doivent être prises lors des différentes étapes qui suivent la prise d'essai : l'extraction, l'amplification et le dépôt sur gel avant l'électrophorèse. La RT-PCR décrite dans cette méthode est particulièrement sensible aux micro-contaminations et la manipulation dans le laboratoire de plusieurs échantillons positifs augmente fortement ce risque, les aérosols, les poussières et autres particules étant autant de vecteurs d'acides nucléiques contaminants. Lors de son évaluation au LNR, il s'est avéré indispensable de mettre en place des précautions spécifiques à cette méthode. Le laboratoire utilisant en routine cette méthode doit impérativement identifier au préalable les étapes critiques en fonction de ses locaux et de son fonctionnement et mettre en place les mesures appropriées pour limiter le risque de dispersion des contaminants.

Par exemple, afin de limiter la diffusion d'éléments contaminants, le laboratoire doit utiliser séparément ou simultanément ces trois mesures :

- la désinfection par les ultra-violets (ex : lampe UV, « cross-linker »),
- la désinfection par une solution de javel à environ 0,5% de chlore actif,
- l'utilisation de matériel à usage unique.

Mises en place aux étapes clés du processus, ces mesures associées à un respect d'une stricte marche en avant favorisant le cloisonnement des étapes par l'utilisation de pièces, de matériel (ex : réfrigérateur/congélateur) ou zones séparées permettent de limiter les risques de contamination.

La principale source de contamination étant le produit d'amplification, il faut évaluer soigneusement les différents éléments en contact avec cet amplifiât et susceptibles de circuler entre les différentes étapes (ex : le manipulateur, les portoirs...). Les étapes d'amplification et d'électrophorèse doivent être strictement cloisonnées par rapports aux autres étapes. Par exemple, l'utilisation de blouses jetables ou dédiées doit être privilégiée. Il faut veiller à la bonne fermeture des tubes PCR avant amplification en privilégiant l'utilisation de films étanches thermoscellables ou de



bouchons parfaitement adaptés. Toute fuite lors de l'amplification ou après amplification doit faire l'objet de mesures appropriées susceptibles d'éliminer toutes traces de contaminants.

Pour exemple, plusieurs mesures pour limiter le risque de dissémination lors des différentes étapes sont proposées dans le tableau ci-dessous :

Etapes	Actions				
	Nettoyage paillasse ⁽²⁾	Changement régulier de blouse	Désinfection UV	Nettoyage du matériel ⁽¹⁾⁽²⁾	Changement de gants
Prélèvement	Entre chaque échantillon	X		Balance de pesée	Entre chaque échantillon
Broyage Extraction	Avant et après manipulation	X	X (Pipettes / cônes / portoirs / tubes / paillasse si équipée d'une lampe UV)	Broyeur, centrifugeuse, bain à sec	Régulièrement au cours des étapes
Préparation du mélange réactionnel	Avant et après manipulation	X (Blouse dédiée)			Avant manipulation
Dépôt des acides nucléiques	Avant et après manipulation	X	X (Pipettes / cônes / portoirs / plaques, tubes et bouchons PCR / paillasse si équipée d'une lampe UV)	Centrifugeuse de plaque/tube	Avant manipulation
Amplification	1 fois par mois	X		Thermocycleur	
Electrophorèse Révélation	Avant et après manipulation	X (Blouse dédiée)		Centrifugeuse de plaque/tube	Avant manipulation

⁽¹⁾ Suivant recommandation fournisseur ; ⁽²⁾ Solution de Javel à environ 0,5% de chlore actif ;

2 Documents de référence

[1] MOA 022 : Techniques qualitatives d'amplification enzymatique des acides nucléiques : PCR (Polymerase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) et PCR temps réel. Détection des organismes phytopathogènes

[2] Directive 2000/29/CE du Conseil du 8 mai 2000 concernant les mesures de protection contre l'introduction dans la Communauté d'organismes nuisibles aux végétaux ou aux produits végétaux et contre leur propagation à l'intérieur de la Communauté Journal officiel n° L 169 du 10/07/2000 p. 0001 – 0022

[3] GLO 001- Glossaire des termes techniques en vigueur au LNPV

[4] Rapport de validation de méthodes : comparaison des méthodes RT-PCR conventionnelle et temps réel pour la détection générique des pospiviroïdes sur plantes herbacées (06/08/2013)

3 Termes, sigles et définitions

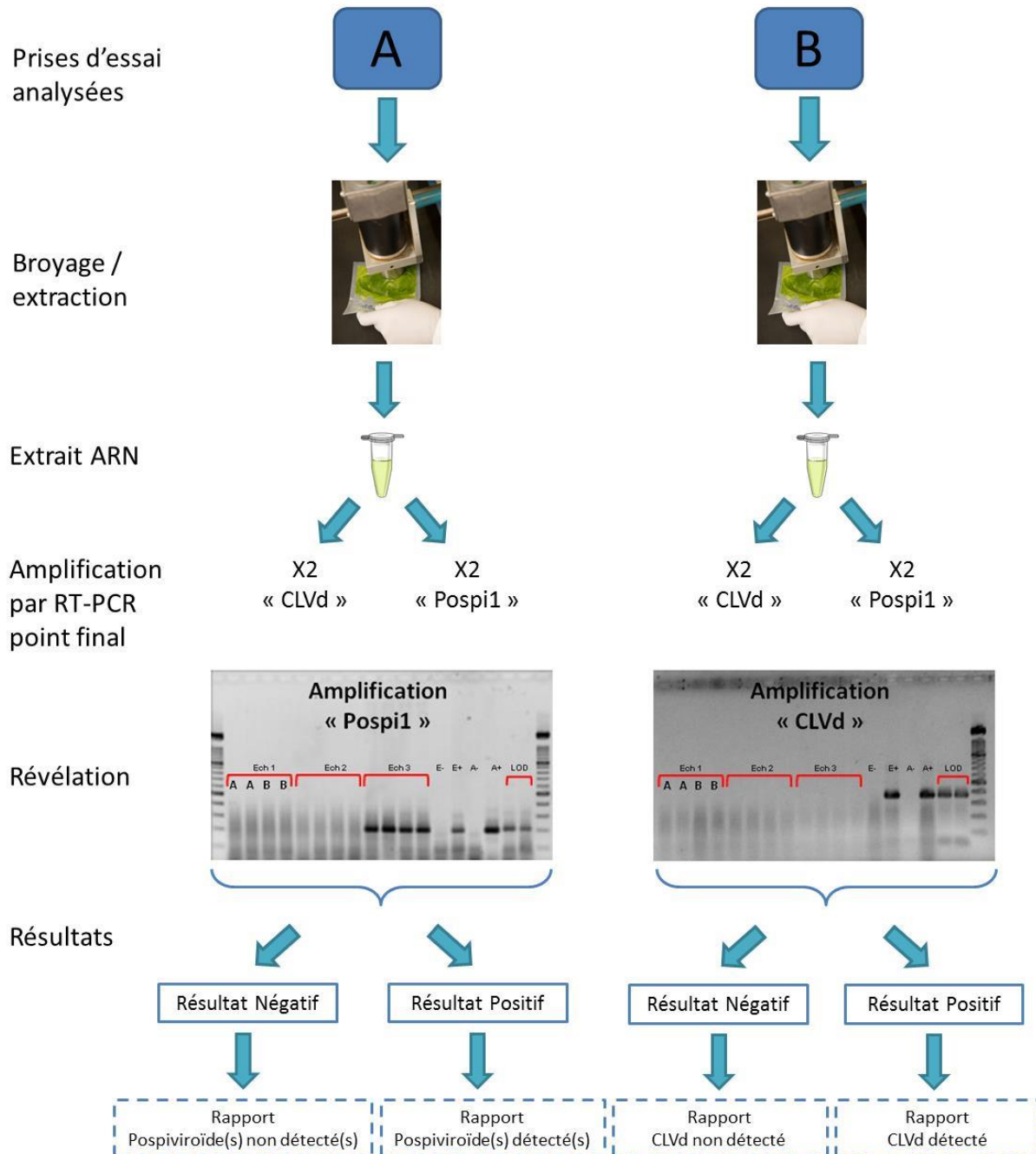
Afin de limiter les problèmes d'interprétation des termes employés, le vocabulaire utilisé dans la présente méthode d'analyse est issu des normes, guides ou glossaires nationaux ou internationaux appropriés (AFNOR, ISO, CIPV, OEPP...).

Le glossaire GLO-001 reprend les principales définitions. L'attention des lecteurs est attirée sur le fait que les termes intégrés au glossaire ne sont, en règle générale, pas spécifiquement repérés dans le corps de la méthode d'analyse.



4 Principe de la méthode

Le principe de la méthode est présenté dans le schéma ci-dessous :



Les échantillons pour lesquels une réponse négative est obtenue sont considérés comme indemnes de la maladie ou contaminés à un niveau trop faible pour être mis en évidence par la méthode. Les échantillons pour lesquels une réponse positive est obtenue sont considérés comme contaminés.



5 Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats de performance.

En règle générale, le manipulateur doit veiller (par l'utilisation de produits et consommables certifiés, nettoyage, stérilisation ou tout autre traitement approprié) à l'absence dans l'eau, produits et consommables utilisés, de contamination (ADN ou ARN), de nucléase, d'inhibiteur ou de tout autre élément pouvant avoir une influence sur le résultat.

Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de stockage avant utilisation, doivent être suivies, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. A défaut le laboratoire définira les conditions qu'il jugera satisfaisantes.

5.1 Eau

Eau ultra pure (EUP) de qualité biologie moléculaire.

5.2 Kits d'extraction d'ARN de plante

Les ARN totaux des échantillons analysés sont extraits et purifiés à l'aide d'un kit d'extraction d'ARN de plante disponible dans le commerce. Le kit d'extraction initialement validé pour cette méthode est le RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen®).

5.3 Oligonucléotides

Cibles	Amorces	Séquences 5' → 3'	Taille amplicons
Tous pospiviroïdes sauf CLVd Verhoeven <i>et al.</i> (2004)	Pospi 1-RE Pospi 1-FW	AGCTTCAGTTGTWTCCACCGGGT GGGATCCCCGGGGAAAC	IrVd : 210 pb Autres : 197 pb
CLVd Spieker (1996)	pCLV4 pCLV4R	GGGGCTCCTGAGACCGCTCTTG GGGGCAACTCAGACCGAGC	CLVd : 359 pb

5.4 Pré-mix commercial

Le kit initialement validé pour cette méthode est le SuperScript® One-Step RT-PCR system with Platinum® Taq DNA polymerase (Référence catalogue ThermoFisher Scientific™ août 2016 n°10928042).

5.5 Contrôles

La technique de détection de régions cibles d'ARN d'un organisme par la technique de RT-PCR inclut l'utilisation d'une série de témoins permettant de valider la bonne qualité de la manipulation. Ces témoins ont différentes fonctions et leur utilisation permet de garantir que :

- l'opérateur a correctement suivi le protocole,
- les consommables et réactifs utilisés étaient de qualité suffisante,
- les volumes prélevés par micropipettes, les températures et durées de réaction, la concentration et le pH des solutions utilisées étaient corrects,
- l'extrait d'ARN était suffisant en quantité et amplifiable (pas d'interférence avec des composés inhibiteurs),
- il n'y a pas eu de contamination accidentelle des échantillons testés.



Les témoins à produire permettant de garantir la fiabilité des résultats au cours de l'analyse sont *a minima* les suivants :

Témoin négatif d'extraction (en général « E- ») : échantillon végétal appartenant à la famille des *Solanaceae* (ou de la même espèce ou famille que les échantillons extraits) reconnu non contaminé par un ou plusieurs des pospiviroïdes détectés par la présente méthode et soumis à toutes les étapes de la méthode. Ce contrôle permet de vérifier qu'aucune contamination ne s'est produite lors de la phase d'extraction/purification de l'ARN (1 puits au minimum par RT-PCR).

Témoin positif d'extraction (en général « E+ ») : échantillon végétal appartenant à la famille des *Solanaceae* (ou de la même espèce ou famille que les échantillons extraits) reconnu contaminé par au moins un pospiviroïde détecté par la présente méthode et soumis à toutes les étapes de la méthode (1 puits au minimum par RT-PCR).

NOTE : Les témoins d'extraction sont traités de la même manière que les échantillons d'essai. Toutefois, 1 seule prise d'essai est nécessaire par série d'extraction.

Témoin négatif de RT-PCR (en général « A- ») : il contient tous les éléments du mélange réactionnel, l'extrait d'ARN est remplacé par le même volume d'eau ultra pure ; Il permet de vérifier l'absence de contamination au cours de la réaction de RT-PCR (1 puits au minimum par RT-PCR).

Témoin positif de RT-PCR (en général « A+ ») : il contient tous les éléments du mélange réactionnel, ainsi qu'un extrait d'ARN cible ; Il permet de vérifier que la réaction de RT-PCR s'est déroulée de façon correcte et permet l'amplification des échantillons contaminés.

NOTE : Les témoins positifs d'extraction des manipulations précédentes peuvent faire office de A+ (1 puits au minimum par RT-PCR).

Témoin positif de RT-PCR en limite de détection (en général « A+ LOD ») : Il peut être réalisé à l'aide d'une gamme de dilution et correspond à la dilution la plus importante d'ARN reconnu positif pour laquelle 3 puits RT-PCR sur 3 donnent un résultat positif. Ce témoin doit être caractérisé par le laboratoire dans ses propres conditions.

Il permet de vérifier que la réaction de RT-PCR s'est déroulée de façon optimale en assurant que la plus petite quantité d'acide nucléique cible est détectable par la méthode dans les conditions de l'essai. Deux puits PCR sont recommandés pour ce témoin.

5.6 Autres consommables à usage unique

- Embouts de pipette avec filtre de volume adapté,
- Microtubes de 1,5 et de 2 mL,
- Microtubes, capillaires ou plaques pour PCR adaptés au thermocycleur utilisé,
- Sachet de broyage en plastique, muni d'une gaze de filtration à mailles en nylon.



6 Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats de performance.

L'agencement et l'équipement des zones de travail sont définis dans la MOA022 en vigueur.

Les matériels utilisés dans la méthode doivent satisfaire aux exigences de la MOA 022 en vigueur.

Afin d'alléger la lecture de la méthode, seules les valeurs cibles des grandeurs mesurées sont indiquées dans le corps du texte, en unités du système international ou unités dérivées. Les erreurs maximales tolérées (EMT) à prendre en considération sont données dans le tableau ci-après (dans le cas contraire, des spécifications sont précisées dans le texte de la méthode).

Grandeur	EMT
Volume	Volume < 10 mL : EMT = $\pm 10\%$ Volume ≥ 10 mL : EMT = $\pm 5\%$
Masse	EMT = $\pm 10\%$
pH	EMT = $\pm 0,3$ unité pH
Température	Incubateur : EMT = $\pm 3^{\circ}\text{C}$ Réfrigérateur : 5°C et EMT = $\pm 4^{\circ}\text{C}$ Congélateur : $\leq -18^{\circ}\text{C}$ Congélateur froid intense : $\leq -65^{\circ}\text{C}$ Bain thermostaté : EMT = $\pm 3^{\circ}\text{C}$ Thermocycleur* : EMT justesse = $\pm 1^{\circ}\text{C}$; EMT homogénéité = $\pm 2^{\circ}\text{C}$
Longueur	EMT = $\pm 10\%$
Temps	EMT = $\pm 10\%$

***Un test biologique (mis en œuvre selon les préconisations de la MOA022) peut venir compléter ou se substituer à la vérification métrologique des thermocycleurs.**

6.1 Thermocycleur pour PCR point final

Cette méthode a été évaluée avec les thermocycleurs « Veriti® » de la société Applied Biosystems®, « Icyler® » de la société Biorad®, « GeneAmp PCR system 9700® » de la société Perkin Elmer®, Labcycler® de la société Sensoquest®, mastercycler® ep. Gradient de chez Eppendorf® et GeneAmp® PCR System 2700 de la société Applied Biosystems®. Tout appareil équivalent possédant des caractéristiques comparables peut être utilisé.

6.2 Broyeur

Cette méthode a été validée en utilisant un broyeur à billes (de type « Homex® » modèle 6 de chez Bioreba). Tout autre système de broyage peut être utilisé, pourvu qu'il permette d'obtenir une qualité de broyage équivalente et limite les risques de contaminations.



7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Limitations relatives aux objets susceptibles d'être soumis à analyse

Le protocole de prélèvement des pospiviroïdes est défini dans les notes de service correspondantes. Le matériel végétal doit arriver au laboratoire dans un état approprié :

- Cas d'échantillons frais : le matériel végétal doit être dans un état de fraîcheur approprié : feuilles sans nécrose ou signe de sénescence.
- Cas d'échantillons congelés : les échantillons doivent avoir été congelés frais sans nécrose ou signe de sénescence. Les échantillons congelés ne doivent pas subir de cycles répétés de congélation/décongélation et ne doivent pas présenter de cristaux et/ou de tissus nécrosés.
- Cas d'échantillons lyophilisés : les échantillons doivent être complètement lyophilisés.

Dans les cas contraires (échantillon en quantité insuffisante, échantillon dégradé,...), le laboratoire émet un accusé de réception à l'attention du client dans les plus brefs délais en précisant l'état dégradé de l'échantillon à la réception au laboratoire. A la demande du client, l'analyse peut cependant être effectuée, dans ce cas le laboratoire émettra des réserves pour tout résultat négatif obtenu.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Dans la mesure du possible et quel que soit le matériel végétal, les prises d'essai doivent être réalisées le jour de la réception puis analysées le plus rapidement possible. Les échantillons frais sont pesés puis conservés à 5°C jusqu'au jour de l'analyse. Les échantillons congelés sont pesés puis conservés à $\leq -18^{\circ}\text{C}$. Le matériel lyophilisé est conservé au sec et à température ambiante de façon à éviter toute réhydratation avant l'analyse.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Pendant et après l'analyse, les reliquats d'échantillons sont à conserver dans les mêmes conditions qu'avant analyse (§7.2) et tel que décrit dans la MOA022 en vigueur.

Pour le cas des échantillons traités dans cette méthode, dans le cas d'un résultat autre que la non mise en évidence de l'organisme recherché, l'ensemble des reliquats pertinents (extrait ARN et reliquat de matériel végétal) doit être conservé pendant une durée minimale de 6 mois, sauf pour les parties éventuellement transmises à un autre laboratoire agréé ou de référence, à qui est alors transférée la charge de conservation des reliquats.

Le laboratoire national de référence peut demander que tout ou partie de ces reliquats lui soient transmis, aux frais des laboratoires agréés ou reconnus, dans le cadre des missions qui lui sont confiées.

Quelque-soit le résultat d'analyse, dans le cas où une analyse de confirmation est nécessaire, l'ARN extrait ainsi que le reliquat de matériel végétal sont à adresser au laboratoire réalisant l'analyse de confirmation.

8 Mode opératoire

Un échantillon correspond à une ou plusieurs feuilles fraîches, congelées ou lyophilisées de plantes herbacées prélevées individuellement ou regroupées. De façon préférentielle, le matériel frais doit être utilisé.

Le laboratoire doit mettre en place une procédure adaptée à son environnement (locaux, infrastructures,...) visant à éviter tout risque de confusion entre échantillons et tout risque de contamination d'un échantillon par un autre.



8.1 Préparation des échantillons pour analyse

La prise d'essai est constituée de 3 fois 1 g de feuilles fraîches ou congelées placés dans 3 sachets de broyage (par exemple sachets A, B et C), ou de 3 fois 0,04 g de feuilles lyophilisées. Les prises d'essai doivent être réalisées de manière à être représentatives de l'échantillon reçu (ex : à partir de chacune des feuilles envoyées,...).

2 sachets sont extraits. Le 3^{ème} sachet est conservé pour pouvoir réaliser une autre analyse en cas de besoin. Les sachets sont stockés comme indiqué dans le paragraphe 7.2.

8.2 Broyage des prises d'essai et extraction de l'ARN total

Le protocole décrit est celui du kit RNeasy® Plant Mini Kit Qiagen® qui a servi à valider la méthode.

- 1- Broyer environ 1 g de matériel végétal frais ou 0,04 g de matériel lyophilisé dans 4,5 mL de tampon RLT (RNeasy® Plant Mini Kit Qiagen®).
- 2- Homogénéiser les sachets contenant le broyat végétal avec les doigts puis transférer 450 µL du broyat dans un microtube et incubé 3 minutes à 56°C.
- 3- Transférer le contenu de chaque tube dans une série codée de colonnes QIAshredder® (violet) puis centrifuger 2 minutes à vitesse maximum.
- 4- Transférer le surnageant dans un tube contenant 2 mL d'éthanol à 96°, homogénéiser et déposer le tout dans une colonne Rneasy® (rose). Centrifuger 1 minute à une vitesse \geq à 8000 g (ou rcf).
- 5- Jeter l'éluat, ajouter 700 µL de tampon « RW1 » dans chaque colonne et centrifuger 1 minute à une vitesse \geq à 8000 g.
- 6- Jeter l'éluat, ajouter 500 µL de tampon « RPE » dans chaque colonne et centrifuger 1 minute à une vitesse \geq à 8000 g.
- 7- Jeter l'éluat, ajouter 500 µL de tampon « RPE » dans chaque colonne et centrifuger 2 minutes à une vitesse \geq à 8000 g.
- 8- Placer chaque colonne sur une nouvelle série codée de microtubes de 1,5 mL, ajouter 30 à 50 µL d'eau ultra-pure RNase free au centre de chaque colonne et attendre 5 minutes.
- 9- Centrifuger 1 minute à une vitesse \geq à 8000 g pour éluer l'ARN.
- 10- Utiliser directement les extraits d'ARN pour réaliser la RT-PCR ou les stocker à $\leq 18^\circ\text{C}$ pour une conservation à moyen terme et à $\leq 65^\circ\text{C}$ pour une conservation à long terme.

8.3 Détection par RT-PCR point final

Ce protocole a été évalué et validé en utilisant le kit SuperScript® One-Step RT-PCR system with Platinum® Taq DNA polymerase. Le laboratoire peut choisir d'utiliser un autre kit, mais il doit apporter la preuve que les critères de performance de la méthode globale ainsi modifiée restent au moins équivalents à ceux de la présente méthode (cf. paragraphe §10).

Remarque : Les extraits ARN sont fragiles et ils ne doivent pas être vortexés avant dépôt dans les microtubes. Afin de limiter les risques de contamination, l'ajout des extraits d'ARN à tester ainsi que des solutions d'ARN servant de témoins s'effectue de préférence dans une zone physiquement séparée de la zone où sont préparés et distribués les mélanges réactionnels. Il est obligatoire d'utiliser un jeu de micropipettes uniquement réservé à cet effet.



8.3.1 Test RT-PCR « Posp1 »

Ce test validé à partir des travaux de Verhoeven *et al.* (2004) permet la détection combinée des pospiviroïdes suivants : PSTVd, TCDVd, TASVd, CSVd, CEVd, TPMVd, PCFVd, IrVd.

- 1- Préparation du mélange réactionnel :
Chaque tube est analysé en duplicat. La composition du mélange réactionnel est la suivante :

Réactifs	Concentration finale	Volume/microtube (en μL)
Tampon de réaction*	1X	12,5
Amorce Posp1 1-RE	1 μM	A calculer
Amorce Posp1 1-FW	1 μM	A calculer
Mix RT / <i>Taq</i> polymerase*		0,5
Eau ultra pure stérile		Qsp 24
Mélange réactionnel		24
Echantillon (ARN)		1
Volume final		25

*kit SuperScript[®] One-Step RT-PCR system with Platinum[®] *Taq* DNA polymerase

- 2- Distribution du mélange réactionnel à raison de 24 μL par puits (plaques, microtubes ou autre consommables adaptés au thermocycleur).
- 3- Ajout de 1 μL de solution d'ARN à tester dans les puits PCR.
- 4- Amplification selon le programme suivant :

Reverse Transcription	43°C	30 min	
Dénaturation initiale	94°C	2 min	
Dénaturation	94°C	30 sec	} 15 cycles
Hybridation	62°C	90 sec	
Elongation	72°C	45 sec	
Dénaturation	94°C	30 sec	} 30 cycles
Hybridation	59°C	90 sec	
Elongation	72°C	45 sec	
Elongation finale	72°C	7 min	

Le produit d'amplification attendu mesure 210 pb pour l'IrVd et 197 pb pour tous les autres pospiviroïdes.

8.3.2 Test RT-PCR « CLVd »

Ce test validé à partir des travaux de Spieker (1996) permet la détection du CLVd. L'amplification est réalisée en deux temps : une phase de dénaturation puis une phase d'amplification à l'aide du kit SuperScript[®] One-Step RT-PCR system with Platinum[®] *Taq* DNA polymerase. Ces deux opérations sont réalisées dans le même tube.



1. Phase de dénaturation

- Préparation du mélange réactionnel de dénaturation :

Réactifs	Concentration finale	Volume/microtube (en μL)
Amorce pCLV4	1 μM	A calculer
Amorce pCLV4R	1 μM	A calculer
Eau ultra pure stérile		Qsp 14 μL
Mélange réactionnel		14 μL
Echantillon (ARN)		1 μL
Volume final		15 μL

- Distribution du mélange réactionnel de dénaturation à raison de 14 μL par puits PCR (plaques, microtubes ou autre consommables adaptés au thermocycleur)
- Ajout de 1 μL de solution d'ARN à tester dans les puits PCR
- Dénaturation selon le programme suivant :

Dénaturation	95°C	3 min
Maintien à	4°C	10 min

2. Phase d'amplification

- Préparation du mélange réactionnel d'amplification :

Réactifs	Concentration finale	Volume/microtube (en μL)
Tampon de réaction*	1 X	25 μL
Mix RT / Taq polymerase*		0,5 μL
Eau ultra pure stérile		Qsp 35 μL
Mélange réactionnel d'amplification		35 μL
Mélange réactionnel de dénaturation		15 μL
Volume final		50 μL

*kit SuperScript[®] One-Step RT-PCR system with Platinum[®] Taq DNA polymerase.

- Distribution du mélange réactionnel d'amplification à raison de 35 μL par puits contenant les 15 μL de mélange réactionnel de dénaturation.



- Amplification selon le programme suivant :

Reverse Transcription	50°C	30 min	
Dénaturation	95°C	4 min	
Dénaturation	95°C	60 sec	} 30 cycles
Hybridation	60°C	60 sec	
Elongation	72°C	60 sec	
Elongation finale	72°C	5 min	

Le produit d'amplification attendu mesure environ 359 pb.

8.3.3 Electrophorèse

Pour chaque produit d'amplification déposer environ 10µL mélangé au tampon de charge sur un gel d'agarose à environ 1 ou 1,5% (Poids/Poids). Un marqueur de taille moléculaire, dont l'intervalle encadre la taille des fragments attendus, doit être déposé sur chaque ligne de dépôt afin de définir la taille des fragments obtenus.

Après révélation, il est conseillé d'effectuer une prise de vue du gel exposé aux UV et d'utiliser cette prise de vue (impression ou fichier informatique) pour analyser les résultats.

9 Résultats

9.1 Contrôle de la validité des résultats

La validation des analyses s'effectue en observant les résultats obtenus par électrophorèse pour les différents témoins. Une série d'analyses (même réaction de RT-PCR) est considérée validée si et seulement si l'ensemble des conditions suivantes est réuni :

Type de contrôle		Résultats attendus	Interprétation
E-	Témoin négatif d'extraction	Négatif	Il n'y a pas eu de contamination lors de l'ensemble du processus (broyage / extraction, RT-PCR)
A-	Témoin négatif d'amplification	Négatif	Il n'y a pas eu de contamination lors la réalisation de la phase de RT-PCR.
E+	Témoin positif d'extraction	Positif	L'ARN cible des échantillons a pu être extrait et amplifié.
A+	Témoin positif d'amplification	Positif	L'ARN cible présent dans l'extrait a pu être amplifié lors de l'étape de RT-PCR.
A+ LOD	Témoin d'amplification en limite de détection	Positif	L'ARN cible présent en limite de détection dans l'extrait a pu être amplifié lors de l'étape de RT-PCR. La performance du test était optimale.

Dans le cas où une ou plusieurs conditions ne sont pas respectées, la série d'analyse n'est pas validée et selon le type d'anomalie observée, tout ou partie de la série d'analyse est à refaire.



9.2 Calculs et expression des résultats

Indépendamment, pour chacune des méthodes (« CLVd » et Pospi1 »), si la série d'analyse est validée, les résultats peuvent être considérés comme interprétables pour l'ensemble des prises d'essai et leurs réplicats testés au cours de la même réaction de RT-PCR. Pour une réaction d'amplification observée sur gel d'agarose, lorsqu'un produit d'amplification est observé à la taille attendue (cf. Paragraphe 5.3), le résultat est considéré comme positif et négatif dans les autres cas.

Le tableau ci-dessous présente les règles de décision pour l'interprétation des résultats quelle que soit la méthode considérée :

Prise d'essai A		Prise d'essai B		Résultat
Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 1	Réplicat 2	
Positif	Positif	Positif	Positif	Positif
Positif	Négatif	Positif	Positif	
Négatif	Négatif	Positif	Positif	
Positif	Négatif	Positif	Négatif	RT-PCR à recommencer pour cet échantillon. Lors de la 2 ^{ème} amplification, Si au moins 2 positifs sur 4, le résultat est interprété comme positif.
Positif	Négatif	Négatif	Négatif	
Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif

Expression des résultats

Le résultat final de l'analyse est exprimé sous forme qualitative, par exemple « négatif/positif », « détecté/non détecté ».

Pour le test RT-PCR « Pospi », le résultat est :

- positif pour au moins un des pospiviroïdes cités lorsque le résultat de la prise d'essai est positif,
- négatif pour tous les pospiviroïdes cités lorsque le résultat de la prise d'essai est négatif.

Pour le test PCR « CLVd », le résultat est :

- positif pour le CLVd lorsque le résultat de la prise d'essai est positif.
- négatif pour le CLVd lorsque le résultat de la prise d'essai est négatif.

10 Caractéristiques de performance de la méthode

La synthèse des caractéristiques de performance de la méthode présentée dans le tableau ci-dessous est extraite du rapport de validation de méthode d'analyse établi par le LNR (version 1 - août 2013). Les caractéristiques des performances des deux amplifications utilisées pour cette méthode sont les suivantes :

	RT-PCR Pospi 1 (Verhoeven <i>et al.</i> , 2004)	RT-PCR CLVd (Spieker, 1996)
Sensibilité	100%	100%
Spécificité	100%	100%
Exactitude	100%	100%
Répétabilité	100%	100%
seuil de détection	1.10 ⁻³ pour PSTVd et 1.10 ⁻⁵ pour TPMVd	1.10 ⁻²
Reproductibilité	92%	100%



Bibliographie

1. EFSA Panel on Plant Health (PLH). Scientific Opinion on the assessment of the risk of solanaceous pospiviroids for the EU territory and the identification and evaluation of risk management options. *EFSA Journal* 2011;9(8):2330. [132 pp.].
2. Flores R, Randles J, Bar-Joseph M, Diener T, 2000. Viroids. In: Van Regenmortel MHVEA, ed. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA: Academic Press, 1009-24.
3. Hadidi A, Flores R, Randles J, Semancik J, 2003. *Viroids: properties, detection, diseases and their control*. Csiro Publishing.
4. Monger W, Tomlinson J, Boonham N, *et al.*, 2010. Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods* **169**, 207-10.
5. Spieker RL, 1996. A viroid from *Brunfelsia undulata* closely related to the *Columnnea* latent viroid. *Archives of Virology* **141**, 1823-32.
6. Verhoeven JTJ, Jansen CCC, Botermans M, Roenhorst JW, 2010. First Report of Iresine viroid 1 in *Celosia plumosa* in the Netherlands. *Plant Disease* **94**, 920-920.
7. Verhoeven JTJ, Jansen CCC, Willems TM, Kox LFF, Owens RA, Roenhorst JW, 2004. Natural infections of tomato by Citrus exocortis viroid, Columnnea latent viroid, Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *European Journal of Plant Pathology* **110**, 823-31.
8. Verhoeven JTJ, Roenhorst JW, Owens RA, 2011. Mexican papita viroid and tomato planta macho viroid belong to a single species in the genus *Pospiviroid*. *Archives of virology* **156**, 1433-1437.

